J 51

Istituto d' Igiene sperimentale della R. Università di Siena

SULLE PARALISI TOSSICHE

DI NATURA CARBONCHIOSA

NOTA

del Dott. ACHILLE SCLAVO

PROFESSORE D' IGIENE NELL' UNIVERSITÀ DI SIENA

Estratto dagli Atti della R. Accademia dei Fisiocritici

Serie IV. Vol. XIII.

SIENA
Tipografia Cooperativa
—
1902

Istituto d' Igiene sperimentale della R. Università di Siena

SULLE PARALISI TOSSICHE

DI NATURA CARBONCHIOSA

NOTA

del Dott. ACHILLE SCLAVO

PROFESSORE D' IGIENE NELL' UNIVERSITÀ DI SIENA

Estratto dagli Atti della R. Accademia dei Fisiocritici

Serie IV. Vol. XIII.

SIENA
Tipografia Cooperativa

1902

Sulle paralisi tossiche di natura carbonchiosa

Nota del Dr. ACHILLE SCLAVO

Professore d' Igiene nell' Università di Siena

Le nostre conoscenze sui veleni batterici si sono in questi ultimi anni molto estese specialmente in grazia degli studi di Ehrlich. Nei filtrati delle culture in brodo del germe della difterite egli trovò che, accanto alle vere e proprie tossine capaci di uccidere, ad una data dose, di forma acuta le cavie, si trovano diverse altre sostanze, le quali, se tutte condividono con le tossine la proprietà di legarsi all' antitossina, o non sono patogene o spiegano un' azione tossica meno grave e tardiva.

Un gruppo di tali sostanze ha ricevuto il nome di tossoni, e la loro esistenza fu messa in chiaro da una delle più memorabili esperienze di Ehrlich.

È a tutti noto per quale procedimento, su proposta di questo autore, veniva tempo fa determinato il valore del siero antidifterico in unità immunizzanti, ciascuna delle quali rappresentava la quantità di siero capace di neutralizzare 100 dosi minime mortali (DMM) per le cavie (gr. 250–300) di veleno difterico in guisa tale che la miscela iniettata sotto cute ad uno di questi animali nè lo uccidesse nè desse luogo alla presenza in 2.ª giornata del più piccolo edema attorno al punto d' iniezione.

Se a tale miscela si aggiunge, come fece Ehrlich, una DMM di veleno difterico c' è a credere che l' animale debba morire, in capo a 4–5 giorni; ciò invece non si verifica ed il numero delle D M M aggiunte può essere portato a cifre notevoli, talora anche a 101, prima che la cavia, soccombendo in 4ª–5ª giornata, provi gli effetti di una sola D M M di veleno difterico. Succede

però che la miscela, perfettamente neutralizzata, appena è addizionata di veleno difterico, anche solo nelle proporzioni di una sola D M M, determina la comparsa di un essudato locale più o meno consistente, che abbastanza presto scompare, senza che si arrivi alla necrosi della cute, nè che avvenga la caduta dei peli. Dopo qualche tempo, che va d'ordinario oltre la terza settimana, compaiono spesso della paralisi di regola seguite dalla morte.

Ehrlich spiega il fenomeno ammettendo che le nuove tossine aggiunte spostino dalle loro combinazioni con l' antitossina altre sostanze analoghe, ma meno energiche e meno tossiche, le quali sono appunto quelle che ricevettero il nome di tossoni e anche di epitossoidi.

Per bene chiarire il concetto di Ehrlich io uso a scopo didattico ricorrere ad un esperimento molto semplice:

Preparate due soluzioni normali di acido cloridrico e acetico verso di ciascuna 10 cm. in una boccetta di Erlenmeyer e poscia aggiungo 20 cm. di una soluzione, parimente normale, di idrato sodico, così ottenendo un liquido perfettamente neutro alla prova colle carte di tornasole. La soda si è qui legata agli acidi come l' antitossina ai veleni difterici e la cartina di tornasole, che non accenna a reazione alcuna, corrisponde alla cavia, che sopporta senza disturbo nè locale nè generale l'iniezione delle 100 D. M. M. di veleno difterico messe di fronte ad 1 *U. I.* di siero antidifterico.

Tingo dopo ciò il liquido con un pò di violetto di metile, il quale gode delle proprietà dl non cambiar colore in presenza di un acido organico (p. es. l' acetico); mentre si fa verde bluastro appena c' è traccia di un acido minerale libero (p. es. di acido cloridrico).

Se faccio quindi cadere goccia a goccia la soluzione normale di acido cloridrico nel liquido violetto non vedo per un certo tempo che esso diventi per ciò verde bluastro come invano si attende la morte delle cavie, che hanno ricevuto la miscela fatta di 1 U. I, di 100 D. M. M. di veleno difterico e di un certo numero in più di D. M. M. di tale veleno.

Eppure quell' acido cloridrico cambia subito la tinta di una soluzione pura acquosa di violetto di metile e rende il primo li-

quido nettamente acido al saggio colle carte di tornasole, decorrendo così il fenomeno in modo esattamente corrispondente a quanto avviene nell' esperienza di Ehrlich, dove, aumentando di uno e anche di più il numero delle D. M. M. oltre le 100 neutralizzate dal siero, l' animale, pur non soccombendo, presenta fenomeni reattivi al luogo d' innesto e più tardi dà segni di paralisi.

Perchè si ottenga il cambiamento della tinta dal violetto al verde bluastro è necessario versare nella soluzione neutra (1) più di 10 cmc. della soluzione normale di acido cloridrico. Tale acido sposta immediatamente l' acido acetico meno energico dalle sue combinazioni con la soda formando cloruro di sodio e solo si manifesta come libero dopo che di acetato sodico non esiste più traccia nel liquido. Come l' acido acetico si comporterebbero dunque i tossoni, e l' acido cloridrico rappresenterebbero quelle altre sostanze, tra cui le tossine, che hanno maggiore affinità per l'antitossina difterica.

E' intanto ben assodato il fatto che mentre le cavie non diventano mai paralitiche, quando ricevono o culture di difterite o filtrati tossici e non troppo vecchi di esse, le paralisi si manifestano adoperando contemporaneamente a questi scarse dosi di siero antidifterico.

Del pari è noto cha nei primi tempi, in cui si ricorse alla sieroterapia contro la difterite, forse perchè allora fecesi uso di sieri meno attivi, si ottenne bensì la diminuzione della mortalità, ma anche si ebbero con maggior frequenza le paralisi postdifteriche.

Un fenomeno consimile mi è occorso di osservare nei conigli a proposito del carbonchio. Nessuno, per quanto mi consta, ha mai parlato di paralisi comparse in seguito alla infezione sottocutanea degli animali coi germi del carbonchio ed a me invece in circa tre anni, dacchè feci ritorno da Sassari a Siena, accadde di veder diventare paralitici 9 conigli su un totale di 352, che per

---

(1) Perchè l' esperimento riesca bene si intiepidisca su bagno maria il contenuto della boccetta di Erlenmeyer quando ancora è neutro alle carta di tornasole; si favorisce in tal modo lo scambio degli ioni e si rende più netto il cambiamento di tinta.

la determinazione del valore del siero anticarbonchioso avevano ricevuto la cultura di carbonchio sottocute ed il siero nelle vene. In tutti i nove conigli la paralisi fu di moto e di senso agli arti posteriori, accompagnandosi a perdita involontaria delle feci e delle orine. Si tratta evidentemente di un' affezione midollare. Alla paralisi flaccida dei primi giorni tenne dietro la contrattura degli arti nei conigli che vissero più a lungo.

In ogni caso però la sopravvivenza non fu lunga e la morte comparve alle volte improvvisamente, in altri casi invece fu preceduta da paresi degli arti anteriori.

Riassumo quì sotto brevemente la storia di otto dei conigli diventati paralitici, avvertendo che la dose di cultura iniettata si mostrò capace nei controlli di procurarne la morte in capo a 24–40 ore circa.

Coniglio N. 1. - grammi 1610.

13 Agosto 1899. Riceve 5 cmc. di siero di pecora nelle vene e la cultura di carbonchio sottocute.

3 Settembre 1899. Paralisi di senso e di moto degli arti inferiori con perdita delle feci e delle urine.

8 Settembre 1899. Muore.

Coniglio N. 2. – gr. 1420.

24 Giugno 1900. Riceve nelle vene 2 cmc. di siero di montone e la cultura sottocute.

11 Luglio 1900. Paralisi come nel coniglio N. 1.

13 Luglio 1900. Muore.

Coniglio N. 3. – gr. 1500.

21 Luglio 1900. Riceve nelle vene 1 cmc. di siero di montone e la cultura sottocute.

15 Agosto 1900. Paralisi come nel coniglio N. 1.

23 Agosto 1900. Presenta contratture agli arti posteriori.

25 Agosto 1900. Muore.

Coniglio N. 4. - gr. 1450.

3 Settembre 1900. Riceve nelle vene 2 cmc. di siero di pecora e la cultura sottocute.

25 Settembre 1900. Paralisi come nel coniglio N. 1.

30 Settembre 1900. Muore.

Coniglio N. 5. – gr. 1370.

28 Ottobre 1900. Riceve nelle vene 2 cmc. di siero di montone e cultura sottocute.

20 Novembre 1900. Paralisi come nel coniglio N. 1.

33 Novembre 1900. Muore.

Coniglio N. 6. – gr. 1400.

30 Novembre 1900. Riceve nelle vene 2 cmc. di siero di pecora e cultura sottocute.

16 Dicembre 1900. Paralisi come nel coniglio N. 1.

21 Dicembre 1900. Muore.

Coniglio N. 7. – gr. 1300.

14 Maggio 1901. Riceve nelle vene 2 cmc. di siero di montone e la cultura sottocute.

1 Giugno 1901. Paralisi come nel coniglio N. 1.

9 Giugno 1901. Muore di setticemia carbonchiosa.

Coniglio N. 8. – gr. 1450.

22 Dicembre 1901. Riceve nelle vene 2 cmc. di siero di pecora e la cultura sottocute.

22 Gennaio 1902. Alle ore 17 riceve di nuovo nelle vene 2 cmc. di siero di pecora e la cultura sottocute. Al momento dell' iniezione pareva che l'animale presentasse un po' di paralisi degli arti posteriori.

23 Gennaio 1902. Paralisi tipica come nel coniglio N. 1.

27 Gennaio 1902. Muore.

I fatti che meritano di essere rilevati da quanto è sopra esposto sono i seguenti:

1.° Le paralisi si presentarono tardivamente dal 16° fino al 31° giorno dopo l' iniezione del siero e delle culture.

2. Esse si manifestarono sempre nello stesso modo, per cui inizialmente furono lese le stesse porzioni del midollo spinale.

3.° In un coniglio la paralisi comparve in 17ª giornata e il coniglio soggiacque all' infezione carbonchiosa 25 giorni dopo essere stato inoculato.

E' questo l' intervallo più lungo che io abbia fin quì osservato per i conigli trattati col siero e con la cultura tra il momento dell' inoculazione e quello della morte per carbonchio.

4.° Una seconda iniezione di carbonchio e di siero in un coniglio già paralitico (N.° 8) non fu seguita dall'infezione generale e l' animale morì come gli altri ugualmente colpiti di paralisi.

All' autopsia ho trovato sempre i visceri amicrobici tranne che per il coniglio N.° 7, da cui ottenni lo sviluppo del germe del carbonchio in cultura pura col materiale ovunque raccolto.

Un attento esame del midollo spinale degli altri conigli non mi svelò alterazione di sorta, nè ebbi mai sviluppo di germi nei mezzi nutritivi insemenzati con notevole quantità di sostanza nervosa del midollo.

Mi riservo di riferire in altra occasione sull' esame istologico sistematico del midollo spinale.

Di fronte ai resultati, che ho sopra riferito, è forza pensare che le paralisi osservate sieno di origine tossica. Ho perciò cercato se nei vari lavori eseguiti, per dimostrare l' esistenza di veleni specifici elaborati dal germe carbonchioso, si fosse trovato qualche sostanza capace di agire nel sistema nervoso paralizzando.

È necessità ammettere che il germe del carbonchio sia in grado di determinare la formazione di speciali sostanze tossiche per poter spiegare i sintomi, che caratterizzano l' infezione carbonchiosa. Quali effetti di un avvelenamento sono indubbiamente da considerarsi e il disfacimento dei globuli rossi, e gli edemi talora enormi e i disturbi dello stato generale, che p. e. nell'uomo sono talora gravissimi mentre in esso è d' ordinario poco spiccata la tendenza del germe ad invadere il sangue. Ma i nu-

merosi tentativi diretti alla ricerca dei veleni carbonchiosi non condussero a risultati concordi.

Mentre Conradi (1) afferma che in nessuna condizione di vita del germe carbonchioso è possibile dimostrare la produzione da parte di esso di un veleno specifico, altri alludono a diversi prodotti, di varia azione, che avrebbero origine per effetto del germe carbonchioso. Però solo in un lavoro di Marmier (2) si fa fugacemente menzione di un veleno paralizzante, ottenuto da speciali culture carbonchiose, il quale darebbe luogo nei conigli, poco prima della morte, alla perdita delle mobilità e della sensibilità degli arti posteriori.

L' autore però attribuisce così poca importanza a tali fenomeni da non ricordarli più in fine del lavoro nelle conclusioni, dove, riassumendo quanto ha trovato sull' azione del veleno carbonchioso, rileva solo l' azione sua cachetizzante.

Vero è che Marmier osservò quelle paralisi soltanto fra i sintomi preagonici, mentre io le constatai parecchi giorni prima dell' esito finale; una tale differenza è molto probabilmente dovuta al siero anticarbonchioso somministrato ai conigli.

Allorchè osservai i primi casi di paralisi non mi potei sottrarre a tutta prima al dubbio che anche il siero dei vari animali adoperato non fosse estraneo alla produzione di quei fenomeni ; mi rassicurava però tosto il pensiero che mai non si avevano avute paralisi in nessuno dei conigli, cui avevo iniettato quantità notevoli di siero, prima di decidermi a farne uso terapeutico per l' uomo.

Del resto un tale dubbio fu completamente dileguato da quanto avvenne in un coniglio, di cui mi ero servito in una serie di esperienze istituite allo scopo di stabilire la durata dell' immunità attiva contro il carbonchio.

Coniglio del peso di gr. 1160.

14 Maggio 1901. Riceve nelle vene 2 cm. di siero anticarbonchioso, e cultura di carbonchio sotto cute.

---

(1) H. Conradi. Zur Frage der Toxinbildung bei den Milzbrandbakterien. Zeitschrift für Hygiene Vol. 31 pag. 287.

(2) *L. Marmier* - Sur la toxine charbonneuse. Annales dell' Institut Pasteur 1895, pag. 533.

7 Giugno. Cultura di carbonchio sotto cute.

5 Luglio. Idem.

21 Luglio. Idem.

21 Gennaio 1902. Idem.

10 Febbraio. Presenta paralisi di senso e di moto agli arti posteriori. Ha perdita involontaria di feci e di urina.

15 Febbraio. Il coniglio ha riacquistato qualche movimento della estremità posteriore.

17 Febbraio. Alla paralisi floscia sono subentrate le contratture. Il coniglio è dimagrato notevolmente.

24 Febbraio. Il coniglio muore alle ore 9,30 e se ne fa subito l' autopsia.

Come si rileva dal soprastante riassunto tale coniglio (A) aveva ricevuto ripetutamente culture di germe carbonchioso riportandone una solida immunità. Dal 21 Luglio fu lasciato per sei mesi in riposo insieme ad altro coniglio B. che era stato ugualmente trattato.

Il giorno 21 Gennaio di quest' anno entrambi i conigli A. B. ricevettero sotto cute 1 cm. di una emulsione di cultura di germe carbonchioso virulentissimo, che in meno di 24 ore uccise alla stessa dose due conigli di controllo. Mentre il coniglio B. sopravvisse senza disturbo alcuno, il coniglio A presentò dopo 20 giorni, la tipica paralisi degli arti posteriori accompagnata da quella del retto e della vescica. Trascorsi altri sette giorni comparvero le contratture e la morte ebbe luogo in 34ª giornata dall' infezione non riscontrandosi nulla di speciale all'autopsia e risultando sterili alle comuni prove culturali gli organi.

Le paralisi in questo coniglio si sono manifestate perchè probabilmente la sua immunità stava per estinguersi non avendo esso, al momento dell' ultimo innesto, ricevuto più cultura da sei mesi ; nè si può quì ragionevolmente attribuire le paralisi al siero, il quale fu iniettato una volta sola nella modica dose di due centimetri cubici ed alla distanza di oltre otto mesi.

Siamo dunque in presenza di un veleno di origine carbonchiosa, il quale predilige le porzioni inferiori del midollo spinale spiegando su di esse tardivamente la sua azione.

Per tale ultimo carattere, che questo veleno ha in comune coi

tossoni difterici, si comprende come le paralisi non riescano a manifestarsi negli animali infettati coi germi del carbonchio, perchè troppo rapidamente interviene l' esito mortale ; che se invece col siero si eccitano in moderata misura i poteri di difesa dell'organismo si potrà bensì ad un bel momento aver la morte dei germi carbonchiosi inoculati ; ma questi in qualche caso potranno aver vissuto abbastanza per produrre il veleno paralizzante.

Veramente queste particolari condizioni si verificherebbero di rado, pochi essendo i conigli che presentano le paralisi di fronte a quelli che sopravvivono senza disturbo di sorta all' iniezione di siero e cultura.

E qui trovo opportuno ricordare che, per quanto prima del 1898 e specialmente nei Laboratori della Sanità in Roma avessi sperimentato su un numero assai rilevante di conigli, non erami occorso mai di osservare quelle paralisi, di cui ho sopra detto.

Ciò può forse dipendere dal fatto che i germi da me allora adoperati erano meno atti a produrre il veleno paralizzante, comportandosi sotto questo riguardo nello stesso modo di alcune varietà di germi della difterite e del tetano, come potrebbe la cosa stare anche in relazione con le modificazioni da me apportate al processo di immunizzazione degli animali destinati alla produzione del siero.

Sperai infatti per molto tempo di accrescere il valore del siero anticarbonchioso aumentando la quantità di cultura di carbonchio da iniettarsi agli animali, e giunsi persino (1) ad introdurre in una sola volta nel peritoneo di un montone 300 cm. di una densa emulsione di germi del carbonchio.

Più tardi, parendomi inutile questo trattamento, ridussi di molto quelle dosi, curandomi specialmente di conservare molto elevata la virulenza dei germi che iniettavo.

Con ciò ho forse rinunziato ad ottenere nel corpo dell' animale, in cui la produzione dei veleni carbonchiosi dovrebbe stare in un certo rapporto con la quantità dei germi iniettati, la formazione di sostanze capaci di neutralizzare quei veleni ; in al-

(1) Sclavo. Sulla preparazione del Siero anticarbonchioso. Memoria 2ª. Rivista di Igiene e Sanità Pubblica 1896 IV 18-19 pag. 13.

tre parole il siero da me più tardi ottenuto avrebbe bensì posseduto la proprietà di esaltare la fagocitosi e il potere battericida degli umori riuscendo con ciò a scongiurare la setticemia carbonchiosa, però minore o forse mancante del tutto sarebbe stata la virtù antitossica, donde la possibilità della comparsa delle paralisi.

In considerazione di ciò ho deciso di avvicinarmi alquanto al metodo di immunizzazione di prima, elevando le dosi di cultura, cui ero solito ricorrere in questi ultimi anni.